

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

27.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年   6 月 2 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 1 9 1 4 2 1  
Application Number:  
[ST. 10/C] :            [ J P 2 0 0 2 - 1 9 1 4 2 1 ]

REC'D 15 AUG 2003

WIPO            PCT

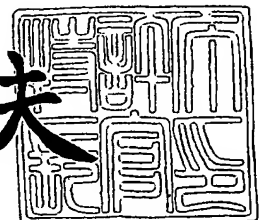
出   願   人            キヤノン株式会社  
Applicant(s):

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年   7 月 3 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 4743001

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明の名称】 プローブ担体の製造方法、製造装置及び品質保証方法

【請求項の数】 104

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社  
社内

【氏名】 橋本 浩行

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社  
社内

【氏名】 岡本 尚志

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プローブ担体の製造方法、製造装置及び品質保証方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の工程：

- (1) 精製プローブを用意する工程、
- (2) 精製プローブのプローブ情報を得る工程、
- (3) 得られたプローブ情報と、予め定められた基準にしたがって、各精製プローブの品質の「良否」を判定する工程、
- (4) 品質が「否」と判定された精製プローブに関して、「良」となる状態のものを得る工程、
- (5) 前記「良」とされた各精製プローブを、(2) で得られたプローブ情報の少なくとも一部に基づき、担体への吐出のための溶媒に、予め定められた濃度で、それぞれ個々に溶解させ、得られた各プローブ溶液を個別の貯溜用容器に収納する工程、
- (6) 前記貯溜用容器に収納された各プローブ溶液を担体への付与のための装置に具備された別の容器に移送する工程、
- (7) 担体にプローブを固定化するための表面処理を施す工程、
- (8) 前記担体の表面処理面に以下の工程を有する方法により前記プローブ溶液を付与して、互いに独立したプローブの固定領域の複数を形成する工程、
  - (8-1) 前記表面処理を施した担体に対して分析検査を行ない、該分析検査の結果と、予め定められた基準にしたがって、該担体の「良否」を判定する工程、
  - (8-2) 前記複数のプローブ溶液から選択された少なくとも一種を前記「良」と判定された担体上へ各プローブ溶液ごとに独立したプローブ付着領域が形成されるように付与する工程、
  - (8-3) 前記プローブ付与領域が形成された担体に対して、該プローブ付着領域の形成状態に関する検査を行ない、該検査結果と、予め定められた基準にしたがって該スポットティングの「良否」を判定する工程、
  - (8-4) 前記「良」と判定されたプローブ付着領域を有する担体に対して、プローブの担体表面への固定化を行いプローブ担体を得る工程、

(8-5) 前記担体上に固定されたプローブからなる複数のプローブ固定領域の少なくとも1つの有するプローブの分析検査を行う工程、及び

(8-6) 前記分析の結果と、予め定められた基準にしたがって、製造されたプローブ担体の「良否」を判定する工程、  
を有することを特徴とするプローブ担体の製造方法。

【請求項2】 以下の工程：

- (a) 標的物質検出用のプローブの複数種を設計する工程、
- (b) 設計された複数種のプローブを合成する工程、
- (c) 合成された複数種のプローブを個々に精製する工程、
- (d) 各精製プローブのプローブ情報を得る工程、
- (e) 得られたプローブ情報と、予め定められた基準にしたがって、各精製プローブにおける合成及び精製状態の「良否」を判定する工程、
- (f) 合成及び精製状態が「否」と判定された精製プローブに関して、前記(b)から(e)の工程を繰り返し、全ての精製プローブの合成及び精製状態を「良」とする工程、
- (g) 前記「良」とされた各精製プローブを、(d)で得られたプローブ情報の少なくとも一部に基づき、担体への吐出のための溶媒に、予め定められた濃度で、それぞれ個々に溶解させ、得られた各プローブ溶液を個別の貯溜用容器に収納する工程、
- (h) 前記貯溜用容器に収納された各プローブ溶液を担体への付与のための装置に具備された別の容器に移送する工程、
- (i) 担体にプローブを固定化するための表面処理を施す工程、
- (j) 前記担体の表面処理面に以下の工程を有する方法により前記プローブ溶液を付与して、互いに独立したプローブの固定領域の複数形成する工程、
  - (j-1) 前記表面処理を施した担体に対して分析検査を行ない、該分析検査の結果と、予め定められた基準にしたがって、該担体の「良否」を判定する工程、
  - (j-2) 前記複数のプローブ溶液から選択された少なくとも一種を前記「良」と判定された担体上へ各プローブ溶液ごとに独立したプローブ付着領域が形成されるように付与する工程、

(j-3) 前記プローブ付与領域が形成された担体に対して、該プローブ付着領域の形成状態に関する検査を行ない、該検査結果と、予め定められた基準にしたがって該スポッティングの「良否」を判定する工程、

(j-4) 前記「良」と判定されたプローブ付着領域を有する担体に対して、プローブの担体表面への固定化を行いプローブ担体を得る工程、

(j-5) 前記担体上に固定されたプローブからなる複数のプローブ固定領域の少なくとも1つの有するプローブの分析検査を行う工程、及び

(j-6) 前記分析の結果と、予め定められた基準にしたがって、製造されたプローブ担体の「良否」を判定する工程、

を有することを特徴とするプローブ担体の製造方法。

【請求項3】 プローブが核酸である請求項1または2の製造方法。

【請求項4】 核酸が一本鎖核酸である請求項3の製造方法。

【請求項5】 一本鎖核酸がオリゴヌクレオチドである請求項4の製造方法

。

【請求項6】 一本鎖核酸がcDNA（コンプリメンタリーDNA）である請求項4の製造方法。

【請求項7】 核酸がペプチド核酸（PNA）である請求項3の製造方法。

【請求項8】 プローブがタンパク質である請求項1または2に記載の製造方法。

【請求項9】 プローブがオリゴペプチドである請求項8の製造方法。

【請求項10】 プローブの設計が塩基配列と鎖長に基づくものである請求項3から7のいずれかに記載の製造方法。

【請求項11】 プローブの設計がアミノ酸配列と鎖長に基づくものである請求項8または9に記載の製造方法。

【請求項12】 プローブの精製が高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography、以下HPLCと略す）法によるものである請求項1または2の製造方法。

【請求項13】 プローブ情報が該プローブの重量である請求項1または2の製造方法。

【請求項 14】 重量の確認がプローブ溶液の濃度に基づくものである請求項 13 の製造方法。

【請求項 15】 プローブ溶液の濃度が、該プローブ溶液の該プローブに特有の吸光波長における吸光度に基づくものである請求項 14 の製造方法。

【請求項 16】 プローブ情報が該プローブの純度である請求項 1 または 2 に記載のプローブチップの製造方法。

【請求項 17】 プローブの純度を求める手段がHPLC法である請求項 16 に記載の製造方法。

【請求項 18】 プローブの純度を求める手段が液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry、以下LC-MSと略す) である請求項 16 の製造方法。

【請求項 19】 プローブの純度を求める手段が、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry、以下MALDIと略す) 法である請求項 16 の製造方法。

【請求項 20】 プローブ情報が核酸の塩基配列情報である請求項 3 から 7 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 21】 塩基配列情報が核酸の質量数である請求項 20 記載の製造方法。

【請求項 22】 プローブ情報がタンパク質、あるいは、オリゴペプチドのアミノ酸配列情報である請求項 8 または 9 に記載の製造方法。

【請求項 23】 アミノ酸配列情報がタンパク質あるいはオリゴペプチドの質量数である請求項 22 記載の製造方法。

【請求項 24】 プローブの質量数を求める手段が、MALDI法である請求項 21 または 23 に記載の製造方法。

【請求項 25】 良否判定の基準が請求項 16 から 19 で求められたプローブの純度において該純度が80%以上であれば「良」とする請求項 1 ～ 24 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 26】 プローブの純度が90%以上である請求項 25 に記載の製造

方法。

【請求項 27】 プローブの純度が95%以上である請求項 26 の製造方法。

【請求項 28】 良否判定の基準が請求項求められたプローブの質量数においてにおいて該質量数が前記プローブの理論質量数に対して $\pm 2.0\text{mu}$ （マスユニット）以内であれば良とする請求項 24 に記載の製造方法。

【請求項 29】 プローブの質量数が前記プローブの理論質量数に対して $\pm 1.0\text{mu}$ 以内である請求項 28 に記載の製造方法。

【請求項 30】 プローブの質量数が前記プローブの理論質量数に対して $\pm 0.5\text{mu}$ 以内である請求項 29 に記載の製造方法。

【請求項 31】 プローブの質量数が前記プローブの理論質量数に対して $\pm 0.1\text{mu}$ 以内である請求項 30 に記載の製造方法。

【請求項 32】 予め定められたプローブの濃度が $200\mu\text{M}$ 以内である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 33】 プローブの濃度が $100\mu\text{M}$ 以内である請求項 32 に記載の製造方法。

【請求項 34】 プローブの濃度が $50\mu\text{M}$ 以内である請求項 33 に記載の製造方法。

【請求項 35】 プローブの濃度が $20\mu\text{M}$ 以内である請求項 34 に記載の製造方法。

【請求項 36】 プローブの濃度が $10\mu\text{M}$ 以内である請求項 35 に記載の製造方法。

【請求項 37】 プローブの濃度が $5\mu\text{M}$ 以内である請求項 36 に記載の製造方法。

【請求項 38】 複数種のプローブ溶液を格納する手段が、複数の凹部（ウェル）を有するマイクロプレートである請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 39】 マイクロプレートのウェル数が96、384、または1536個である請求項 38 に記載の製造方法。

【請求項 40】 担体がガラス基板である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。



【請求項 4 1】 担体がシリコン基板である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 4 2】 担体が金属基板である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 4 3】 担体に対するプローブの固定化が共有結合によって行われる請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 4 4】 担体に対する表面処理が、洗浄、および、プローブの固定に必要な処理である請求項 1、2 または 4 3 に記載の製造方法。

【請求項 4 5】 表面処理を施した担体に対する分析検査が、洗浄後、または、プローブの固定に必要な各処理工程後の担体の接触角を測定するものである請求項 4 4 に記載の製造方法。

【請求項 4 6】 洗浄後の接触角が10度以下である担体を「良」とする請求項 4 5 に記載の製造方法。

【請求項 4 7】 洗浄後の接触角が8度以下である担体を「良」とする請求項 4 6 に記載の製造方法。

【請求項 4 8】 洗浄後の接触角が6度以下である担体を「良」とする請求項 4 7 に記載の製造方法。

【請求項 4 9】 前処理各工程後の接触角が、予め定められた値に対して、±2.5度以内である担体を「良」とする請求項 4 5 に記載の製造方法。

【請求項 5 0】 表面処理を施した担体に対する分析検査を、洗浄後、または、プローブの固定に必要な各処理工程後の担体を飛行時間型二次イオン質量分析 (Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry、以下TOF-SIMSと略す) 法によって行う請求項 4 3 に記載の製造方法。

【請求項 5 1】 TOF-SIMSによる分析が、ハロゲンイオン、アルカリ金属イオン、表面処理剤に起因する二次イオン、ガラスなどの担体に起因する二次イオンの内の一つまたは複数の強度を利用することを特徴とする請求項 5 0 に記載の製造方法。

【請求項 5 2】 表面処理を施した担体に対する分析検査を、洗浄後、または、プローブの固定に必要な各処理工程後の担体をX線光電子分光 (X-ray Photo

electron Spectroscopy、以下XPSと略す) 法によって行う請求項 4 4 に記載の製造方法。

【請求項 5 3】 XPSによる分析が、Si 2p, C 1s, O 1s, N 1sの4つの光電子ピークの強度（ピーク面積）を利用することを特徴とする請求項 5 2 に記載の製造方法。

【請求項 5 4】 XPSによる分析が、Si 2p, C 1s, O 1s, N 1sの4つの光電子ピークの強度比（ピーク面積比）を利用することを特徴とする請求項 5 2 に記載の製造方法。

【請求項 5 5】 XPSによる分析が、Si 2pと N 1sの光電子ピークの強度比（ピーク面積比）N 1s/Si 2pを利用することを特徴とする請求項 5 4 に記載の製造方法。

【請求項 5 6】 プローブをスポッティングする手段が単数、もしくは、複数のピンを具備した装置である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 5 7】 プローブをスポッティングする手段が単数、もしくは、複数のマイクロシリンジを具備した装置である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 5 8】 プローブをスポッティングする手段が単数、もしくは、複数のインクジェットノズルを具備した装置である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 5 9】 インクジェットノズルがピエゾジェットノズルである請求項 5 8 に記載の製造方法。

【請求項 6 0】 インクジェットノズルがサーマルジェットノズルである請求項 5 8 に記載の製造方法。

【請求項 6 1】 前記複数のピン、マイクロシリンジ、インクジェットノズル、ピエゾジェットノズル、または、サーマルジェットノズルの数が前記複数種のプローブの種数以上である請求項 5 6 から 6 0 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 6 2】 前記複数のインクジェットノズル、ピエゾジェットノズル、または、サーマルジェットノズルの数が100以上である請求項 6 1 に記載の製造方法。

【請求項 6 3】 前記複数のインクジェットノズル、ピエゾジェットノズル、または、サーマルヘッドノズルの数が500以上である請求項 6 2に記載の製造方法。

【請求項 6 4】 前記複数のインクジェットノズル、ピエゾジェットノズル、または、サーマルヘッドノズルの数が1000以上である請求項 6 3に記載の製造方法。

【請求項 6 5】 前記複数のインクジェットノズル、ピエゾジェットノズル、または、サーマルヘッドノズルの数が2000以上である請求項 6 4に記載の製造方法。

【請求項 6 6】 前記プローブをスポッティングする装置が、前記移送されるプローブ溶液を収納する容器を、前記インクジェットノズル、ピエゾジェットノズル、サーマルヘッドノズルの数に対応して具備している請求項 6 1 から 6 5 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 6 7】 プローブ溶液を収納する容器の容量が $100\mu\text{l}$ 以下である請求項 6 6 に記載の製造方法。

【請求項 6 8】 プローブ溶液を収納する容器の容量が $50\mu\text{l}$ 以下である請求項 6 7 に記載の製造方法。

【請求項 6 9】 プローブ溶液を収納する容器の容量が $20\mu\text{l}$ 以下である請求項 6 8 に記載の製造方法。

【請求項 7 0】 プローブ溶液を収納する容器の容量が $10\mu\text{l}$ 以下である請求項 6 9 に記載の製造方法。

【請求項 7 1】 プローブ溶液を収納する容器の容量が $5\mu\text{l}$ 以下である請求項 7 0 に記載の製造方法。

【請求項 7 2】 プローブ溶液を収納する容器の容量が $2\mu\text{l}$ 以下である請求項 7 1 に記載の製造方法。

【請求項 7 3】 プローブ溶液を収納する容器の容量が $1\mu\text{l}$ 以下である請求項 7 2 に記載の製造方法。

【請求項 7 4】 プローブ溶液を収納する容器が、前記プローブをスポッティングする装置に一体型に形成されている請求項 6 6 から 7 3 のいずれかに記載

の製造方法。

【請求項 7 5】 プローブ溶液の付与に関する検査が目視（肉眼）によって行われる請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 7 6】 プローブ溶液の付与に関する検査が光学顕微鏡によって行われる請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 7 7】 光学顕微鏡が実体顕微鏡である請求項 7 6 に記載の製造方法。

【請求項 7 8】 光学顕微鏡が位相差顕微鏡である請求項 7 6 に記載の製造方法。

【請求項 7 9】 光学顕微鏡が微分干渉型である請求項 7 6 に記載の製造方法。

【請求項 8 0】 光学顕微鏡が走査型共焦点レーザー顕微鏡 7 6 である請求項に記載の製造方法。

【請求項 8 1】 スポットティングに関する検査項目が、スポットの有無、スポットの径、スポットの形状、スポットティングされた液量、及び、スポットの配置である請求項 7 5 から 8 0 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 8 2】 担体上に固定されたプローブを分析する手段が TOF-SIMS 法である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 8 3】 TOF-SIMS 法による分析が担体上にスポット状に固定化されたプローブをスポット状にイメージングしながら行う請求項 8 2 に記載の製造方法。

【請求項 8 4】 イメージングが一次イオンのランダムラスタースキャンによるものである請求項 8 3 に記載の製造方法。

【請求項 8 5】 TOF-SIMS 法によって得られるシグナルが、プローブに起因する特定の二次イオンであることを特徴とする請求項 8 2 または 8 3 に記載の製造方法。

【請求項 8 6】 TOF-SIMS 法によって得られるシグナルが、核酸プローブに起因する特定の二次イオンであることを特徴とする請求項 8 5 に記載の製造方法。

。

【請求項 87】 二次イオンのデータが、 $P^-$ 、 $PO^-$ 、 $PO_2^-$ 、または $PO_3^-$ のいずれかひとつの値、または複数値の合算値である請求項 86 に記載の製造方法。

【請求項 88】 担体上に固定されたプローブを分析する手段がMALDI法である請求項1または2 に記載の製造方法。

【請求項 89】 プローブのすくなくともプローブ部分全体がMALDI法で用いるレーザー光によって担体表面から切断される構造を有する構造で担体に共有結合されている請求項 87 に記載の製造方法。

【請求項 90】 担体上に固定されたプローブを分析する手段がXPS法である請求項1または2 に記載の製造方法。

【請求項 91】 担体上に固定されたプローブを分析する手段がXPS法によるイメージングである請求項 90 に記載の製造方法。

【請求項 92】 XPS法によるイメージングが、 $10\mu m$ 程度に集光された軟X線を走査することにより光電子の二次元像を得るものであることを特徴とする請求項 91 に記載の製造方法。

【請求項 93】 XPS法によるイメージングが、集光されていない軟X線を被分析試料に照射し、放出される光電子を電子レンズを使って投影させることで二次元像を得るものであることを特徴とする請求項 91 に記載の製造方法。

【請求項 94】 担体上に固定されたプローブを分析する手段が走査型プローブ顕微鏡（Scanning Probe法Microscopy、以下SPMと略す）法である請求項1または2 に記載の製造方法。

【請求項 95】 担体上に固定されたプローブを分析する手段が原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscopy、以下AFMと略す）法である請求項 94 に記載の製造方法。

【請求項 96】 担体上に固定されたプローブを分析する手段が走査型電気化学顕微鏡（Scanning Electrochemical Microscopy、以下SECMと略す）法である請求項1または2 に記載の製造方法。

【請求項 97】 担体上に固定されたプローブを分析する手段が低真空走査型電子顕微鏡（Environmental Scanning Electron Microscopy、以下ESEMと略す）法である請求項 1 または 2 に記載の製造方法。

【請求項 98】 請求項 1 から 97 のいずれかに記載のプローブ担体の製造方法に用いる製造用システムであって、

各精製プローブのプローブ情報を取得するための分析装置と、

各精製プローブにおける合成及び精製状態の「良否」を判定するための検査用装置と、

前記「良」とされた各精製プローブの溶液のそれぞれを個別に収納した貯溜用容器から供給された各プローブ溶液を担体へ付与するための装置と、

前記表面処理を施した担体の分析装置と、

前記プローブ付与領域が形成された担体に対して、該プローブ付着領域の形成状態に関する「良否」の検査を行う検査装置と、

前記「良」と判定されたプローブ付着領域を有する担体に対して、プローブの担体表面への固定化を行いプローブ担体を得るための装置と、

前記担体上に固定されたプローブからなる複数のプローブ固定領域の少なくとも 1 つの有するプローブの分析検査を行うための装置と  
を有することを特徴とするプローブ担体の製造用システム。

【請求項 99】 請求項 1 から 97 のいずれかに記載のプローブ担体の製造方法に用いる製造用システムであって、

設計された複数種のプローブを合成するための合成装置と、

合成された複数種のプローブを個々に精製するための精製装置と、

各精製プローブのプローブ情報を取得するための分析装置と、

各精製プローブにおける合成及び精製状態の「良否」を判定するための検査用装置と、

前記「良」とされた各精製プローブの溶液のそれぞれを個別に収納した貯溜用容器から供給された各プローブ溶液を担体へ付与するための装置と、

前記表面処理を施した担体の分析装置と、

前記プローブ付与領域が形成された担体に対して、該プローブ付着領域の形成状態に関する「良否」の検査を行う検査装置と、

前記「良」と判定されたプローブ付着領域を有する担体に対して、プローブの担体表面への固定化を行いプローブ担体を得るための装置と、

前記担体上に固定されたプローブからなる複数のプローブ固定領域の少なくとも 1 つの有するプローブの分析検査を行うための装置と  
を有することを特徴とするプローブ担体の製造用システム。

【請求項 100】 請求項 1 から 97 に記載に記載の製造方法のいずれか、または、請求項 98 または 99 に記載の製造用システムを用いて、担体への付与前のプローブ溶液中のプローブ、表面処理担体、プローブ溶液付与後のプローブ付着領域、及び、プローブ溶液付与後に担体に固定化されたプローブの、いずれか、もしくは、全てを分析検査することによって、プローブチップの品質を保証することを特徴とするプローブ担体の品質保証方法。

【請求項 101】 プローブチップが、請求項 1 から 97 に記載に記載の製造方法、または、請求項 98 または 99 に記載の製造用システムによって製造されたプローブ担体である請求項 100 に記載の品質保証方法。

【請求項 102】 分析検査データが、プローブ担体上の複数のプローブの固定領域の少なくとも 1 つについて存在している請求項 100 または 101 に帰記載の品質保証方法。

【請求項 103】 請求項 1 から請求項 97 に記載の製造方法のいずれか、または、請求項 98 または 99 に記載の製造用システムを用いて製造されたプローブ担体。

【請求項 104】 請求項 100 から 102 のいずれかに記載の品質保証方法によって品質が保証されたプローブ担体。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、複数のプローブが担体上にマトリクス状などに配置されたプローブ担体（プローブチップやバイオチップなどともいう）の製造方法、製造装置、及び、品質保証方法、ならびに、これら製造方法、製造方法、及び、品質保証方法によって、製造、ならびに、品質保証されたプローブ担体に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術課題】

DNAチップ、また、プロテインチップ等のプローブチップはゲノム解析、あるいは、遺伝子の発現解析などの遺伝子情報の取得を目的として利用されるようになってきており、また、それらの解析の結果は、癌、遺伝病、生活習慣病、感染症等の診断、予後予想、治療方針の決定等に重要な指標を提供するものと期待されている。

#### 【0003】

上記プローブチップの製造方法にはいくつかの方法が知られている。DNAチップを例にとって説明すると、

(1) 基板上にフォトリソグラフィーを用いてDNAプローブを逐次的に合成していく方法（米国特許第5405783公報等）、あるいは、

(2) あらかじめ合成したDNA、または、cDNA（コンプリメンタリーDNA）を基板上に供給し固定する方法（米国特許第5601980公報、特開平11-187900号公報、Science Vol.270, 467, 1995等、Nature Biotechnology Vol. 18, 438, 2000）が代表的なDNAチップの作製方法である。

#### 【0004】

一般的には、このような方法によってプローブチップが製造されるが、これらのプローブチップを先に述べた用途に使用しようとする場合、解析の信頼性、すなわち、定量性、再現性を保証するためには各マトリクスを構成する互いに区分されたプローブの固定領域（スポットあるいはドットともいう）に存在するプローブの量、つまり、密度を知ることが重要である。また、実際にどのようなマトリクス形状（形状、サイズ、状態）で存在するかを知ること（イメージング）も、チップの作製方法等によっては重要である。さらに、プローブチップを多数供給する場合を考えると、上記の各マトリクスに存在するプローブの量の、製造ロット内、あるいはロット間のばらつきや、純度を把握することが信頼性を確保する上で極めて重要となる。

#### 【0005】

上記製造方法（1）は、多数種のプローブをチップ上に配置する方法としては優れているが、基板上でプローブを逐次的に合成するので、原理的に、所定のプローブ鎖長より、例えば、一塩基ずつ順次短い、用途からみて望ましくないプロ



ープが、これも原理的に、欠損部の位置が特定できない場合を含んで（不純物として）混在することが、程度の差はあれ避けることができない。この問題は一旦発生すると、こちらも原理的に基板上に形成されたプローブを精製することができないので、結果として、この手法で製造されたチップの信頼性の欠如を意味することになる。この場合、仮に製造されたチップ上のプローブの上述したような分析が可能であったとしても、精製が不可能である以上、その意義は低下する。

#### 【0006】

さて、一方、製造方法（2）では、予め合成、精製、濃度、純度等の検定を経たプローブを用いることができるので、その意味ではチップの信頼性の向上を図ることが可能であり、また、上述したチップ上でのプローブの分析が可能であれば、その結果を、もしくは、チップ製造の各工程の分析検査結果を、各工程、または、上記のプローブの合成、精製、濃度、純度等の検定工程にフィードバックすることによってチップの品質保証が可能となる。

#### 【0007】

しかしながら、原理的に、プローブチップ上のプローブは単分子膜レベルで存在し、また、近年、（製造方法によっては）マトリクスサイズが、 $10\mu\text{m}$ 程度まで小さくなってきており、その場合、各マトリクスに存在するプローブは極めて微量となる。そのため、プローブチップ上の各マトリクスの分析には極めて高感度な表面解析技術が必要となる。

#### 【0008】

これらの高感度な表面解析技術はいくつか知られており、そのなかで、例えば、プローブをアイソトープラベルする方法は、手法が煩雑、危険、特殊な施設、装置が必要等の理由で一般的ではない場合が多い。

#### 【0009】

また、別の方法としてはプローブを蛍光標識する方法、または、プローブと特異的に結合する物質に蛍光標識を施し、これとプローブを結合させる方法、すなわち、核酸チップであれば、蛍光ハイブリダイゼーション法は、蛍光色素の安定性、クエンチング、蛍光色素の基板表面への非特異的吸着、また特異的結合（ハイブリダイゼーション）の定量性（安定性、再現性）等の問題があり、プローブ

自体の存在量を定量的に把握するには課題が残る場合がある。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、これら従来のプローブチップ製造方法、製造工程、製造装置（群）あるいは製造用システムの問題点、また、従来の製造方法、製造工程、製造装置（群）あるいは製造用システムによって製造されたプローブチップの品質保証上の課題を鋭意検討した結果本発明を為すに至った。

【0011】

本発明の目的は、効果的な検査プログラム及び製造工程により品質保証されたプローブ担体を適用するための技術を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明にかかるプローブ担体の製造方法の第1の態様は、以下の工程：

- (1) 精製プローブを用意する工程、
- (2) 精製プローブのプローブ情報を得る工程、
- (3) 得られたプローブ情報と、予め定められた基準にしたがって、各精製プローブの品質の「良否」を判定する工程、
- (4) 品質が「否」と判定された精製プローブに関して、「良」となる状態のものを得る工程、
- (5) 前記「良」とされた各精製プローブを、(2)で得られたプローブ情報の少なくとも一部に基づき、担体への吐出のための溶媒に、予め定められた濃度で、それぞれ個々に溶解させ、得られた各プローブ溶液を個別の貯溜用容器に収納する工程、
- (6) 前記貯溜用容器に収納された各プローブ溶液を担体への付与のための装置に具備された別の容器に移送する工程、
- (7) 担体にプローブを固定化するための表面処理を施す工程、
- (8) 前記担体の表面処理面に以下の工程を有する方法により前記プローブ溶液を付与して、互いに独立したプローブの固定領域の複数を形成する工程、
- (8-1) 前記表面処理を施した担体に対して分析検査を行ない、該分析検査の

結果と、予め定められた基準にしたがって、該担体の「良否」を判定する工程、  
（８－２）前記複数のプローブ溶液から選択された少なくとも一種を前記「良」と判定された担体上へ各プローブ溶液ごとに独立したプローブ付着領域が形成されるように付与する工程、  
（８－３）前記プローブ付与領域が形成された担体に対して、該プローブ付着領域の形成状態に関する検査を行ない、該検査結果と、予め定められた基準にしたがって該スポットティングの「良否」を判定する工程、  
（８－４）前記「良」と判定されたプローブ付着領域を有する担体に対して、プローブの担体表面への固定化を行いプローブ担体を得る工程、  
（８－５）前記担体上に固定されたプローブからなる複数のプローブ固定領域の少なくとも１つの有するプローブの分析検査を行う工程、及び  
（８－６）前記分析の結果と、予め定められた基準にしたがって、製造されたプローブ担体の「良否」を判定する工程、  
を有することを特徴とするプローブ担体の製造方法である。

### 【0013】

本発明にかかるプローブ担体の製造方法の第２の態様は、以下の工程：

- （a）標的物質検出用のプローブの複数種を設計する工程、
- （b）設計された複数種のプローブを合成する工程、
- （c）合成された複数種のプローブを個々に精製する工程、
- （d）各精製プローブのプローブ情報を得る工程、
- （e）得られたプローブ情報と、予め定められた基準にしたがって、各精製プローブにおける合成及び精製状態の「良否」を判定する工程、
- （f）合成及び精製状態が「否」と判定された精製プローブに関して、前記（b）から（e）の工程を繰り返し、全ての精製プローブの合成及び精製状態を「良」とする工程、
- （g）前記「良」とされた各精製プローブを、（d）で得られたプローブ情報の少なくとも一部に基づき、担体への吐出のための溶媒に、予め定められた濃度で、それぞれ個々に溶解させ、得られた各プローブ溶液を個別の貯溜用容器に収納する工程、

- (h) 前記貯溜用容器に収納された各プローブ溶液を担体への付与のための装置に具備された別の容器に移送する工程、
- (i) 担体にプローブを固定化するための表面処理を施す工程、
- (j) 前記担体の表面処理面に以下の工程を有する方法により前記プローブ溶液を付与して、互いに独立したプローブの固定領域の複数を形成する工程、
- (j-1) 前記表面処理を施した担体に対して分析検査を行ない、該分析検査の結果と、予め定められた基準にしたがって、該担体の「良否」を判定する工程、
- (j-2) 前記複数のプローブ溶液から選択された少なくとも一種を前記「良」と判定された担体上へ各プローブ溶液ごとに独立したプローブ付着領域が形成されるように付与する工程、
- (j-3) 前記プローブ付与領域が形成された担体に対して、該プローブ付着領域の形成状態に関する検査を行ない、該検査結果と、予め定められた基準にしたがって該スポッティングの「良否」を判定する工程、
- (j-4) 前記「良」と判定されたプローブ付着領域を有する担体に対して、プローブの担体表面への固定化を行いプローブ担体を得る工程、
- (j-5) 前記担体上に固定されたプローブからなる複数のプローブ固定領域の少なくとも1つの有するプローブの分析検査を行う工程、及び
- (j-6) 前記分析の結果と、予め定められた基準にしたがって、製造されたプローブ担体の「良否」を判定する工程、
- を有することを特徴とするプローブ担体の製造方法である。

#### 【0014】

本発明にかかるプローブ担体の製造用のシステムの第1の態様は、上記プローブ担体の製造方法に用いる製造用システムであって、

各精製プローブのプローブ情報を取得するための分析装置と、

各精製プローブにおける合成及び精製状態の「良否」を判定するための検査用装置と、

前記「良」とされた各精製プローブの溶液のそれぞれを個別に収納した貯溜用容器から供給された各プローブ溶液を担体へ付与するための装置と、

前記表面処理を施した担体の分析装置と、

前記プローブ付与領域が形成された担体に対して、該プローブ付着領域の形成状態に関する「良否」の検査を行う検査装置と、

前記「良」と判定されたプローブ付着領域を有する担体に対して、プローブの担体表面への固定化を行いプローブ担体を得るための装置と、

前記担体上に固定されたプローブからなる複数のプローブ固定領域の少なくとも 1 つの有するプローブの分析検査を行うための装置と  
を有することを特徴とするプローブ担体の製造用システムである。

#### 【0 0 1 5】

本発明にかかるプローブ担体の製造用のシステムの第 2 の態様は、上記プローブ担体の製造方法に用いる製造用システムであって、

設計された複数種のプローブを合成するための合成装置と、

合成された複数種のプローブを個々に精製するための精製装置と、

各精製プローブのプローブ情報を取得するための分析装置と、

各精製プローブにおける合成及び精製状態の「良否」を判定するための検査用装置と、

前記「良」とされた各精製プローブの溶液のそれぞれを個別に収納した貯溜用容器から供給された各プローブ溶液を担体へ付与するための装置と、

前記表面処理を施した担体の分析装置と、

前記プローブ付与領域が形成された担体に対して、該プローブ付着領域の形成状態に関する「良否」の検査を行う検査装置と、

前記「良」と判定されたプローブ付着領域を有する担体に対して、プローブの担体表面への固定化を行いプローブ担体を得るための装置と、

前記担体上に固定されたプローブからなる複数のプローブ固定領域の少なくとも 1 つの有するプローブの分析検査を行うための装置と  
を有することを特徴とするプローブ担体の製造用システムである。

#### 【0 0 1 6】

本発明にかかるプローブ担体の品質保証方法は、上記の製造方法または上記の製造用システムを用いて、担体への付与前のプローブ溶液中のプローブ、表面処理担体、プローブ溶液付与後のプローブ付着領域、及び、プローブ溶液付与後に

担体に固定化されたプローブの、いずれか、もしくは、全てを分析検査することによって、プローブチップの品質を保証することを特徴とするプローブ担体の品質保証方法である。

#### 【0017】

本発明にかかるプローブ担体は上記の製造方法または上記の製造用システムを用いて製造されたプローブ担体であり、上記の品質保証方法によって品質が保証されたプローブ担体である。

#### 【0018】

本発明におけるプローブ担体の製造方法における第1の態様及び製造用システムの第1の態様においては、用意された精製プローブは、品質を予め設定された基準に基づいて検査される。また、精製プローブから得られるプローブ情報が、精製度に依存しない場合は、精製度を判定しない状態でプローブ情報を得る工程を行うことができる。精製度に依存する場合は、精製度に関する基準で品質を検査し、所定の精製度のものが入手できた段階で、プローブ情報を得る方法が採用できる。

#### 【0019】

本発明にかかるプローブ担体は、プローブ固定領域の少なくとも1つの分析データや全体としての品質保証データが添付されていることを特徴とするもので、これらのデータは紙への印刷、媒体への電子ファイルデータなど各種の形態で提供され、これらはプローブ担体と別に設けられていても、プローブ担体と一体化された形態でもよい。

#### 【0020】

また、プローブの固定領域をマトリクス状に配置した場合、複数のプローブに対する上記のデータがイメージデータとして添付されてもよい。

#### 【0021】

本発明によれば、効果的な検査プログラム及び製造工程により品質保証されたプローブ担体を適用するための技術を提供することが可能となる。

#### 【0022】

#### 【発明の実施の形態】

本発明において担体上に固定されたプローブは、特定の標的物質に対して特異的に結合可能なものである。例えば、DNAやRNAなどの核酸の場合は、標的核酸の有する塩基配列と相補的な配列をプローブが有することで、これらのハイブリッド体を形成し得るものである。

#### 【0023】

本発明においては、ドットやスポットなどの形状で核酸プローブが固定されたドット状などのプローブ固定領域を担体上に有するものをプローブ担体といい、プローブ固定領域の複数あるいは多数のそれぞれを互いに独立させて担体上の所定位置に例えばマトリックス状に配列したものをプローブアレイという。なお、このプローブ担体には、通常、マイクロアレイ、プローブチップ、DNAチップ、RNAチップ等の核酸チップなども含まれる。

#### 【0024】

なお、担体としては、各種形状及び材料からなるものから選択することができ、例えばガラス基板、シリコン基板、金属基板などが好適に利用できる。

#### 【0025】

以下、本発明の性質上、本発明のいくつかの具体的な形態または実施例に基づいて、本発明における、従来技術を解決する手段、及び、本発明の実施の形態を説明する。

#### 【0026】

本発明は、基本的に以下の工程の一部、もしくは、全部からなるプローブ担体（以下プローブチップという）の製造方法、製造工程、これらの製造方法、製造工程を可能ならしめる製造装置（群）または製造用システム、これらの製造方法、製造工程、製造装置（群）によって製造されるプローブチップの品質保証方法、また、上記製造方法、製造工程、製造装置（群）によって製造され、品質保証されたプローブチップである。

#### 【0027】

すなわち、本発明にかかるプローブチップの製造方法の好ましい態様は、以下の工程を有する。

- (1) 数種のプローブを設計する工程。

- (2) 設計された複数種のプローブを合成する工程。
- (3) 合成された複数種のプローブを精製する工程。
- (4) 合成、精製された複数種のプローブのプローブ情報を得る工程。
- (5) 得られたプローブ情報と、予め定められた基準にしたがって、上記複数のプローブの、それぞれの「合成、精製」の「良否(“good” or “not good” )」を判定する工程。
- (6) 前工程において、「合成、精製」が「否」と判定された単数、もしくは、複数のプローブに関して、(2) から (5) の工程を繰り返し、全てのプローブの「合成、精製」を「良」とする工程。
- (7) 上記「合成、精製」が「良」とされた複数種のプローブを、(4) で得られたプローブ情報の一部に基づき、下記スポッティングのための溶媒に、予め定められた濃度で、それぞれ、溶解し、容器に収納する工程。
- (8) 上記、容器に収納された複数のプローブ溶液の一部(量)を、下記スポッティングのための装置に具備された別の容器に移送する工程。
- (9) 下記スポッティングを行うための基板にプローブを固定化するための表面処理を施す工程。
- (10) 上記表面処理を施した基板に対して分析検査を行ない、該分析検査の結果と、予め定められた基準にしたがって、該基板の「良否(“good” or “not good” )」を判定する工程。
- (11) 前記「良」と判定された複数種のプローブ溶液の全部(種)、または、一部(種)を上記「良」と判定された基板上へマトリクス状にスポッティングする工程。
- (12) 上記スポッティングを施した基板に対して、スポッティングに関する検査を行ない、該検査結果と、予め定められた基準にしたがって該スポッティングの「良否(“good” or “not good” )」を判定する工程。
- (13) 上記「良」と判定されたスポッティングが施された基板に対して、プローブが基板上に固定化されるに必要な処理を行う工程。
- (14) 基板上に固定された、一部、もしくは、全部のスポット内のプローブの分析検査を行う工程。



(15) 上記分析の結果と、予め定められた基準にしたがって、製造されたプローブチップの「良否」を判定する工程。

#### 【0028】

以下、それぞれのプローブチップ製造工程、製造装置（群）、及び、これらの製造工程、製造装置（群）によって製造されるプローブチップ、該プローブチップの品質保証方法について詳細に説明する。

#### 【0029】

図1に本発明におけるプローブチップ製造工程のうち、プローブを基板へ結合する方法の一例の模式図を示した。本図ではプローブとして18量体（18mer）オリゴヌクレオチド（DNA：一本鎖核酸）を示したが、本発明のプローブとしてはオリゴヌクレオチドに限定されるわけではなく、その他の核酸（cDNAなど）、ペプチド核酸などの核酸アナログ、オリゴペプチド、タンパク質などのプローブを用いることが可能であるが、これらは基板に結合するにあたって、予め設計、設計に基づく合成、精製、純度の検定等が可能であることが本発明のひとつの要諦である。

#### 【0030】

プローブの設計とは、設計されるべきプローブと特異的に結合する物質、核酸プローブの場合にはゲノムDNA、遺伝子DNA、mRNA等の調べたい部分の核酸塩基配列と、基本的には相補的な、場合によってはいくつかの塩基が相補的ではない塩基配列をプローブとして設定することであり、ペプチド、蛋白質の場合にはアミノ酸配列の設定ということになる。また、プローブをどれだけの長さとするかもプローブ設計の一部であり、さらには、プローブを基板上に固定する際の、例えば共有結合に必要なリンカー、官能基を設定することも、広義にプローブの設計といえる。

#### 【0031】

図1に示した方法は、基板としてガラス基板を用いて、ここに合成オリゴヌクレオチドプローブを共有結合させる方法の一例で、ガラス基板を、一級アミノ基を有するシランカップリング剤（KBM-603：信越化学工業、図の構造式は加水分解後の構造を示す）で処理し、ついで、二官能性架橋剤N-(4-Maleimidobutrylo

xy)succinimide (EMCS: 同仁化学研究所) のスクシイミドエステル基と上記シランカップリング剤のアミノ基とを反応させる。最後に、しかるべき塩基配列を有し、かつ、一方の末端にリンカー（図ではリンカー構造は省略してある）を介してチオール (SH) 基を結合したオリゴヌクレオチドプローブの該チオール基と、上記EMCSのマレイミド基とを反応結合させて、ガラス基板にオリゴヌクレオチドプローブが共有結合されることになる。なお、図のプローブが最終的にガラス基板に結合している部分のシランカップリング剤とガラス基板との結合は模式的に示したものである。

#### 【0032】

本発明では、例えば、このような方法で、基板上に複数種のプローブがマトリクス状に配置されたプローブチップを作製する。複数種のプローブ溶液を基板上に付与（スポット）する方法としては、ピン法、マイクロシリンジ法、あるいは、ピエゾジェット、サーマルジェット法等のインクジェット法を例にあげることができる。

#### 【0033】

すでに述べたように、本発明の特徴のひとつは、予め合成、精製され、純度等の検定を行ったプローブを用いて、また、チップ製造の各プロセスを適切に監視し、さらに製造されたチップの分析検査して、それぞれの検定、分析、検査結果を相互に対照して、製造各工程を管理し、最終的にチップの品質を保証することにある。

#### 【0034】

その際、プローブの精製はHPLC 法を用いれば、用いる装置、カラムによっては比較的大量のプローブを簡便に精度よく精製可能である。HPLC法、すなわち、高速液体クロマトグラフィー法とは、主として、生体物質を含む有機化合物の混合物を分離する手段の一つで、移動相に液体を用いるクロマトグラフィーの一種である。

#### 【0035】

また、本発明では上記精製されたプローブの情報を得てプローブの良否を判定して、次工程に進む判断をすることを、その特徴のひとつとするが、その際、得

るべきプローブの情報としては、第一に、合成、精製されたプローブの収量、すなわち、重量をあげることできる。この場合、合成後のプローブの量が微量であることが多いので、実際の重量を測定するというよりは、一定の割合で溶解、希釈したプローブの濃度を測定するのが現実的で、その方法としては、通常行われている手法、すなわち吸光法を用いればよい。核酸は、塩基配列によって微妙に異なるが、260nm付近に吸収極大をもつので、この波長で吸光度を測定し、予め計算された当該プローブのモル吸光係数と対照することによってプローブ溶液の濃度、すなわち、収量を求めることができる。

#### 【0036】

プローブ情報の第二はその純度である。上述のようにプローブをHPLCで精製しようとしても、合成時の不純物として、例えば、オリゴヌクレオチドプローブの場合であれば、一塩基ずつ短い一連のオリゴヌクレオチドが含まれる場合があり、これが所望の鎖長のプローブとHPLCの溶出時間が近接しているようなときには、その近接度や精製時の分取範囲によっては、精製後の不純物の量が比較的多くなる場合がある。このような場合に備えて、精製後のプローブの純度をあらためて定量的に確認する必要がある。そのような確認はHPLC、また、液体クロマトグラフィーの検出器として質量分析計を用いたLC-MS法、あるいは、MALDI法によって行うことができる。

#### 【0037】

LC-MSの検出器、すなわち、質量分析計としては、四重極 (quadrupole) 型、イオントラップ (ion trap) 型、飛行時間 (Time of Flight) 型、磁場型、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (Fourier Transform ion cyclotron resonance: FT-ICR) 型などがある。また、LC-MSに用いられるイオン化方法としては、電子スプレーイオン化法 (Electrospray Ionization: ESI)、大気圧化学イオン化法 (Atmospheric Pressure Chemical Ionization: APCI) などがある。本発明では、これらを適宜使用して分析する。

#### 【0038】

つぎに、MALDIの測定原理について以下簡単に説明する。

#### 【0039】

まず、試料とマトリクスと呼ばれるイオン化を起こしやすい物質を混ぜて試料台にのせ、ここにマトリクスが吸収可能な波長のレーザー光をパルス照射し、マトリクスをイオン化させる。ほぼ同時に、マトリクスからの電荷移動によって被分析試料がイオン化する（この電荷移動は瞬時に進む。なお、マトリクス共存における試料のイオン化のメカニズムは正確には知られていない。）。試料台上には高電界が印加されており、イオン化された被分析試料は、イオン化されたマトリクスと共に飛行時間型質量分析計へ導かれる。その際、軽いイオンほど速く、反対に重いイオンほど遅い速度で飛行するため、イオンが発生してから検出されるまでの時間（飛行時間）を測定することで、発生したイオンの質量を分析することができる。MALDIで採用しているイオン化方法は、被分析試料にダメージを与え難い、すなわち解裂を生じ難いソフトな方法（ソフトイオン化法）として知られている。また、MALDI市販機種の中には複数の試料を連続的に測定できるものもある。

#### 【0040】

MALDI法は、上述のように、比較的マイルドな条件で被検物質をイオン化するので、物質のイオンそのものの質量を分析することが可能である。すなわち、MALDI法によってプローブを分析すれば、例えば、オリゴヌクレオチドプローブであれば、一塩基異なれば、質量数として300mu以上の差となってあらわれるので、分離分析は容易、かつ、確実で、また、定量分析も可能である。

#### 【0041】

本発明では、これらの手法によってプローブの純度を検定して、合成、精製されたプローブをチップ製造に用いるか否かの判断をするが、純度判定の基準は、製造されるプローブチップの利用形態によって異なる。すなわち、チップによって被検体の有無をしらべるだけであれば、80%程度の純度で十分な場合もあるが、厳密に定量性が要求される場合には、90%、望ましくは95%以上の純度が必要とされる。

#### 【0042】

プローブ情報の第三は、当然のことながら、所望のプローブが得られたか、すなわち、核酸プローブであれば、塩基配列、鎖長、その他の構造、また、タンパ

ク質プローブであれば、アミノ酸配列、鎖長、その他の構造等が合成されたかということである。これらの情報は正確には配列を厳密に調べることで等によって把握されるべきではあるが、そのような操作はきわめて煩瑣であるので、場合によっては、本発明では、代替手段として質量分析を行う。質量分析の手段としては、既述のMALDI法を用いることができる。ただし、質量分析で判断されるのは、核酸であれば、塩基の組成、タンパク質であれば、アミノ酸の組成であって、塩基配列、アミノ酸配列そのものではない。しかしながら、質量が所定のものと異なれば、所望のプローブが合成されていないことを示していることになり、有力な情報であることはいうまでもない。

#### 【0043】

MALDI法は、サンプル調製、マスキャリブレーションの良否によって、多少分析データに変動があることが知られているが、核酸を例にとると、各塩基の質量数は、アデニン：135. 1、グアニン：151. 1、シトシン：111. 1、チミン：126. 1と、ある程度差があるので、本発明では、やはり、チップに求められる厳密性の程度により、良否判定の基準として、測定された質量数が、プローブの理論質量数に対して、 $\pm 2.0\text{mu}$ （マスユニット）以内、 $\pm 1.0\text{mu}$ （マスユニット）以内、 $\pm 0.5\text{mu}$ （マスユニット）以内、 $\pm 0.1\text{mu}$ （マスユニット）以内と適宜設定する。

#### 【0044】

さて、これまで述べてきた工程によってプローブの合成、及び、合成の確認がなされるが、本発明では、最終的にチップ上に固定されるプローブを保証するために、この段階において、合成、収量、純度が「否」と判定されたプローブに関しては、あらためて、この段階までの工程を繰り返して、最終的に全てのプローブを「良」とする。

#### 【0045】

さて、合成、収量、純度が「良」と判定されたプローブに関して、実際のチップの作製が行われる。この際、「良」と判定されたプローブをしかるべき濃度で溶解して、上記表面処理が施された基板上にスポッティングすることになる。この場合の濃度は、スポッティング装置、スポッティング液滴量、所望のスポッテ

リング径、基板表面のプロープが結合すべき官能基の密度、反応性、反応時間等と、上記プロープの収量によって決められるが、必要以上に高濃度である必要は経済的な観点や、製作されるチップの品質の面からも不要であるし、逆に低濃度過ぎる場合は、チップ上に形成されるプロープ密度が低下する結果となって好ましくない。本発明では、上述の各観点から、プロープ濃度を、 $200\mu\text{M}$ 以内の範囲で適宜設定する。場合によっては $1\mu\text{M}$ 以内に設定してもよい。

#### 【0046】

このように適切な濃度、及び、量に溶解された複数種のプロープは、次の工程のスポッティングに備えて、しかるべく容器中に収納されるが、本発明では、場合によっては、このように容器中に収納された状態で冷凍保存、また、該容器からスポッティング装置にプロープ溶液を分注装置等を用いて移送する。また、本発明のチップは、必要に応じて、100種程度から1000種以上のプロープを搭載するので、これらの場合に備えて、上記プロープを収納する容器は、96、384、または1536個のウェルを有するマイクロプレートであることが好ましい。

#### 【0047】

つぎに、本発明のチップに用いる基板、また、基板にプロープを固定する処理に関して、さらに詳しく説明する。

#### 【0048】

本発明で用いられるチップ上へのプロープの固定化方法の例をすでに図1に示したが、単にプロープの固定という見地からは、プロープを固定する基板は、どのような材質、形状であってもかまわないし、本発明でも場合によってはそれがかまわない。一方、本発明では、プロープを固定する前の基板、あるいは、プロープを固定した後の基板を分析して、チップの品質を保証することを特徴のひとつとするので、基板の材質、形状、また、表面状態は、該分析に適していることがこのましいことになる。そういう意味では、基板が剛直で、表面を滑らかに加工可能な、ガラス基板、シリコン基板、金属基板が望ましく、また、後述するように、チップ分析の手段によっては、基板の導電率とうの性質が分析に影響を与える場合があるので、その場合には、分析の手段によって、ガラス基板、シリコン基板、金属基板を適宜使用することが望ましい。さらにいえば、ガラス基板も

、石英、パイレックスなど、その種類によって、性質が異なるので、こちらも適宜使い分けることができる。

#### 【0049】

基板に対するプローブの固定は、該プローブ、もしくは、固定方法の分析が可能であれば、どのようなものでもかまわなく、基板表面へのプローブの吸着、静電的結合など、非共有結合でもかまわないが、後述するように、分析時にプローブ等のイオン化等をともなう場合には、分析の安定性、再現性の点から、例えば、図1に示したような共有結合が望ましい場合がある。また、実際のチップの使用形態、例えば、チップを高温状態におくような場合にも、プローブは基板に共有結合で固定されていることが望ましい。

#### 【0050】

本発明ではチップ製造を目的として基板にほどこされた表面処理に関して、その処理の「良否」を判定するために、分析を行うが、該表面処理とは、基板の洗浄、あるいは、プローブの固定に必要な処理、プローブを共有結合で固定する場合には、該共有結合に必要な処理のことをいい、これらの処理後に、適宜分析をおこなって、該表面処理の「良否」を判定する。

#### 【0051】

上記表面分析の手段として第一にあげることができるのは、接触角の測定である。接触角測定に関する詳細な説明は省くが、基本的に、表面の濡れ性等の状態を、該表面と、該表面上に寄せられた液体の液滴が形成する角度によって表わそうとするものであり、理想的には、ある特定の表面処理がほどこされた表面は、特定の液体（例えば水）に対して、特定の接触角を示す。

#### 【0052】

本発明では、まず、基板表面の洗浄状態の「良否」を接触角によって判定する。判定の基準は、基板材質、洗浄方法、また、必要とされる洗浄状態によって設定されるが、本発明では、それら場合により、10度以下、5度以下程度まで、段階に適宜設定する。5度以下になると、液体が濡れ拡がる状態となり、測定自体の再現性、信頼性がともなわないので、値としては設定が困難である。その他の基板表面処理についていえば、本発明の表面処理は、洗浄済みの基板に比較して

、接触角が増大するので、その特定の接触角に関して、おのおの±2.5程度以内を、表面処理の「良否」の判定基準とする。

#### 【0053】

本発明の、その他の表面処理基板の分析手段としては、TOF-SIMS法や、XPS法をあげることができる。

#### 【0054】

質量分析法の一手法として知られている、TOF-SIMS法は、固体試料の最表面にどのような原子または分子が存在するかを調べるための分析方法であり、以下の様な特徴を持つ。すなわち、 $10^9 \text{atoms/cm}^2$ （最表面1原子層の $1/10^5$ に相当する量）の極微量成分の検出能があること、有機物、無機物のどちらにも適用できること、表面に存在する全ての元素や化合物を測定できること、試料表面に存在する物質からの二次イオンのイメージングが可能なことである。

#### 【0055】

以下、この方法の原理を簡単に説明する。高真空中で、高速のイオンビーム（一次イオン）を固体試料表面に照射すると、スパッタリング現象によって表面の構成成分が真空中に放出される。このとき発生する正または負の電荷を帯びたイオン（二次イオン）を電場によって一方向に収束し、一定距離だけ離れた位置で検出する。スパッタの際には、試料表面の組成に応じて様々な質量をもった二次イオンが発生するが、軽いイオンほど早く、反対に重いイオンほど遅い速度で飛行するため、二次イオンが発生してから検出されるまでの飛行時間を測定することで、発生した二次イオンの質量を分析することができる。

#### 【0056】

同様な方法として知られるdynamic-SIMS法では、イオン化の際に有機化合物が小さいフラグメントイオンまたは粒子にまで分解してしまうため、質量スペクトルから得られる化学構造情報が乏しいのに対し、TOF-SIMSでは一次イオン照射量が著しく少ないため、有機化合物は化学構造を比較的保った状態でイオン化され、質量スペクトルから有機化合物の構造を知ることができる。固体試料表面の最も外側で発生した二次イオンのみが、真空中へ放出されるので、試料の最表面（深さ数Å程度）の情報を得ることができる。



## 【0057】

TOF-SIMS装置には大きく分けてセクター型とリフレクトロン型のふたつのタイプがある。これらの方法の違いのひとつは被分析試料を固定するホルダの電気的な接地方法である。セクター型では装置の機構上、上記ホルダに数kVの正または負の電圧を印加することで二次イオンを質量分析計に導いているのに対し、リフレクトロン型ではホルダは接地され、二次イオン引き出し電極に数kVから数10kVの正または負の電圧を印加することで二次イオンを質量分析計に導いている。

## 【0058】

TOF-SIMS法では正の一次イオンが多用されるが、一次イオンの極性にかかわらず正の二次イオンと負の二次イオンが発生する。また、一次イオンの極性にかかわらず、一般的な測定条件では一次イオンの照射により二次電子が発生し、この二次電子の発生量が一次イオン量に比べて多量であるために、結果として被分析試料の表面は正に帯電し易く、この帯電電荷が過剰になると（いわゆるチャージアップ状態）測定に支障をきたすことになる。その際、装置構成を考えると、セクター型装置を用いて絶縁物の負の二次イオンを測定する場合に最も大きく正に帯電し得るといえる（発生した二次電子が全て、上記の正電圧を印加した二次イオン引き出し電極に向かってしまうため）。

## 【0059】

上記の正帯電を中和するため、セクター型、リフレクトロン型の両タイプとも帯電中和用のパルス型電子銃を装備することが多い。この電子銃による具体的な帯電中和方法とは、一次イオン（サブ〜数nsecパルス）照射、正または負の二次イオンの飛行時間計測の後、次の一次イオンパルスを照射するまでの間に、上記パルス型電子銃からの電子線を被分析試料に一定時間照射する、というものである。なお、上記電子線を被分析試料に照射する間は、セクター型における試料ホルダへの電圧印加、および、リフレクトロン型における二次イオン引き出し電極への電圧印加はともに停止され、接地される。

## 【0060】

この方法により、上記の正帯電は緩和され（若しくは解消し）、絶縁物の分析

が可能となることが多いが、上記の説明と同様、セクタ型装置を使った絶縁物の測定で、負の二次イオンを測定する場合が最も大きく正に帯電し易いため、帯電中和のマージンはこの場合が最も狭い。いずれにしても、チャージアップを回避するには、試料ホルダが電氣的に接地されているリフレクトロン型の装置を使う方が、セクター型装置を使うよりも（一般的には）有利である。特に被分析試料の導電率が低い場合（抵抗率が高い、もしくは、誘電率が高いと言い換えることができる）、例えば、ガラス等の場合にはリフレクトロン型の方が測定に適しているといえる。

#### 【0061】

他方、XPS法は、超高真空中で被分析試料に軟X線を照射し、光電効果により表面から放出される光電子の運動エネルギーを分析するもので、該光電子のピーク位置から元素の種類とその酸化状態（化学結合状態）が、ピーク面積の比から表面におけるおよその元素組成（比）がそれぞれ求まる。XPS法の対象とする分析深さは数nmで、固体試料を非破壊的に分析でき、水素以外の全元素を測定できるという長所を持つ一方、検出限界は0.1atmic%程度である。分析深さが異なるため単純には比較できないが、TOF-SIMS法と比べると感度は2～3桁劣る。一方、TOF-SIMS法は高感度で、水素を含む全元素が分析対象であるが、基本的に破壊分析であるため定量精度が高くないという欠点を持つ。

#### 【0062】

本発明では、これらの手法を状況に応じて適宜選択して、表面処理後の基板表面を分析して、例えば、洗浄状態、不純物の存在、表面処理層の存在状態、表面処理層の結合状態等を、定性的、あるいは、定量的に分析して、予め定められた基準に従って、表面処理の「良否」の判定を行う。

#### 【0063】

例えば、XPS法を上記目的に用いる場合、図1に示す構成の基板に対しては、Si 2p, C 1s, O 1s, N 1sなどの光電子ピーク面積やその面積比が上記「良否判定」の指標として使用することができる。より具体的には、シランカップリング剤や二官能性架橋剤中に含まれる窒素はガラス基板には通常含まれないため、シランカップリング剤や二官能性架橋剤で処理した基板表面から放出されるN 1sピー

クの絶対強度（ピーク面積）やこれをSi 2pのピーク面積で除したN 1s/Si 2p比が重要な「良否判定」の指標となる。

#### 【0064】

また、基板処理プロセスでコンタミネーションとして付着し易いNa, S, ClなどはXPS法で比較的高感度で検出できる元素であるため、これらの高電子ピーク（例えば、Na 1s, S 2p, Cl 2pなど）の有無も「良否判定」に使用することができる。

#### 【0065】

TOF-SIMS法は上述したように定量性にやや欠けるため、上記目的に用いる場合には注意を要するが、高感度である特徴を生かし、ハロゲンイオンやアルカリ金属イオンなどの不純物に起因する二次イオンの強度が「良否判定」の指標となる。また、上記シランカップリング剤や二官能性架橋剤に起因する二次イオンの強度またはそれらの相対強度も「良否判定」の指標として使用することができる。

#### 【0066】

つぎに、本発明では、これまで述べてきた、「良」と判定されたプローブをしかるべく溶液として、「良」と判定された表面処理後の基板へスポッティングして、プローブを基板へ固定するが、この際、スポッティングする手段は、後述するような、スポッティング後の液滴の状態や、最終的に基板に結合するプローブの状態等に関する「良」たる判定基準を満足させるものでなくてはならない。

#### 【0067】

本発明では、プローブをスポッティングする手段として、単数、もしくは、複数のピンを具備した装置、単数、もしくは、複数のマイクロシリンジを具備した装置、単数、もしくは、複数のインクジェットノズルを具備した装置から、上記判定基準に従って適宜選択する。インクジェットノズルとしては、ピエゾジェットノズル、サーマルジェットノズルを好適に使用できる。

#### 【0068】

前記複数のピン、マイクロシリンジ、インクジェットノズル、ピエゾジェットノズル、または、サーマルジェットノズルの数は、すでに述べた複数種のプローブ種の数に対して少ないと、プローブ溶液の再充填、あるいは、そのために要す

る時間等の影響で、後に述べる、スポッティング後の液滴状態や、固定されたプローブ状態の品位を低下させるのでこのましくない場合があり、そのような場合には、ピン、マイクロシリンジ、インクジェットノズル、ピエゾジェットノズル、または、サーマルジェットノズルの数は数種のプローブの種数以上、すなわち、100以上、500以上、1000以上、または、2000以上であることが好ましいといえる。この際、ある程度の数以上になると、ピン法やマイクロシリンジ法ではスポッティング装置を作製することが困難になることがある。ピエゾジェットノズルやサーマルジェットノズルであれば、インクジェットプリンターを見るまでもなく、微細加工技術を用いてスポッティング装置を製造するので、多ノズル装置に適しているといえる。

#### 【0069】

上記微細加工技術をもちいれば、インクジェットノズルの集合体（ヘッド）に、該インクジェットノズルの数に応じて、上述した、移送されるべきプローブ溶液を収納する容器を場合によっては一体型に具備させることができる。使用するプローブは合成、精製、純度のチェックを経たものであり、コスト等の観点から、その使用量は必要最小限であることが望ましいが、本発明では、合成収量、使用する濃度、スポッティングする液量、作製するチップの枚数、インクジェットヘッドの構成等によって適宜、前記容器の容量と、使用するプローブ溶液の量を選択する。その際の容器の容量は $100\mu\text{l}$ 以下から $1\mu\text{l}$ 程度まで適宜選択できる。例えば、 $100\mu\text{l}$ 以下、 $50\mu\text{l}$ 以下、 $20\mu\text{l}$ 以下、 $10\mu\text{l}$ 以下、 $5\mu\text{l}$ 以下、 $2\mu\text{l}$ 以下または $1\mu\text{l}$ 以下とすることが好ましい。

#### 【0070】

以上、プローブ溶液を、基板上にスポッティングするまでを説明してきたが、次工程はスポッティングされた液滴の検査である。

#### 【0071】

プローブ溶液中のプローブの予め定められた濃度としては、 $200\mu\text{M}$ 以下が好ましく、例えば、 $100\mu\text{M}$ 以下、 $50\mu\text{M}$ 以下、 $20\mu\text{M}$ 以下、 $10\mu\text{M}$ 以下または $5\mu\text{M}$ とすることができる。

#### 【0072】

上記スポットの検査項目としては、最終的にチップの品質に直接係る項目であるので重要であり、スポットの有無、スポットの径、スポットの形状、スポットされた液量、スポットの配置、本来あるべきではない、例えば、微小なスポット、付随的にはゴミの有無等をあげることができる。また、本発明では、それぞれに関して「良否」を判定する基準を設けて、「良」であれば、さらに次の工程に進む。判定の基準としては、例えば、スポットの径では、定められた径の±10%以内、スポットの形状では真円度が一定の基準以内、スポットの配置では、定められた配置ラインに対してスポット径の±10以内等と設定する。スポットされた液滴の量を検査する方法としては、例えば、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、スポット形状を三次元的に測定して、この形状から液滴の量を計算する方法があげられる。

#### 【0073】

これら、スポットの検査方法としては、目視（肉眼）、実体顕微鏡、位相差顕微鏡法、または、微分干渉顕微鏡法等をともなった光学顕微鏡法、あるいは、上記、共焦点レーザー顕微鏡を用いることができる。

#### 【0074】

上記スポットティングに関する検査が「良」と判定されたチップについては、さらに、プローブを基板表面に固定させるべき条件、例えば、共有結合によって結合させる場合には、しかるべき温度と、液滴の揮発を防ぐために飽和水蒸気圧にコントロールされたチャンバー中に、しかるべき時間静置して、反応を行う。

#### 【0075】

さて、つぎに最後の検査項目である、基板上に固定されたプローブの分析検査について説明する。冒頭で述べたように、プローブは場合によっては、原理的に単分子膜レベルで基板上に固定されていて、マトリクス（スポット）サイズが、10 $\mu\text{m}$ 程度まで小さくなっている場合もあり、このような場合には、きわめて高感度な表面分析手段が必要となる。また、ここまでの製造工程を経てきたチップのプローブのスポット形状等を調べようとする、単に原子、分子等の分析に加えて、高感度な二次元イメージング技術も必要不可欠である。

#### 【0076】

TOF-SIMS法により、基板に固定した単分子膜レベルでの核酸が検出された例はすでに報告があり (Proceeding of the 12<sup>th</sup> International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry 951, 1999)、この例では、TOF-SIMSで検出可能な核酸フラグメントイオンとして塩基の分解フラグメントイオン、および、リン酸バックボーンの分解フラグメントイオンがあげられているが、上述のような必要性をふまえて、本発明では、基板上に固定されたプローブを分析する手段のひとつとしてTOF-SIMS法を用いる。前述のようにTOF-SIMS法はきわめて高感度な表面分析方法であるので、本発明に関わる、チップ上に形成されたプローブの分析にはきわめて適している。TOF-SIMS法では、上記二次元イメージングも可能であるために、本発明に関して、さらに好適である。

#### 【0077】

上述したように、TOF-SIMS法では測定時に基板の表面を電氣的に中和してチャージアップを防止する機能を用いることができ、比較的導電性の低い、例えば、ガラス基板の表面でも測定することが可能であるが、二次元イメージングの場合には、よりチャージアップの影響を受けやすい場合があり、そのような場合には、本発明では、一次イオンのスキャンをランダムに行い (ランダムラスタースキャン)、チャージアップを防止する手段により、チップの分析を行う。

#### 【0078】

TOF-SIMS法では、上述のように、一次イオン照射により発生する被検物質由来の二次イオンを分析するが、プローブチップでは、イオン化効率、感度、S/N比等から、二次イオンとしてプローブ由来のしかるべきイオンを選択することが好ましい。本発明では、例えば、核酸プローブでは、そのような観点から、二次イオンのデータとして、 $P^-$ 、 $PO^-$ 、 $PO_2^-$ 、または $PO_3^-$ のいずれかひとつの値、または複数の値の合算値を用いて、二次元イメージングを含むプローブの分析を行う。

#### 【0079】

プローブの分析のその他の手段としては、すでに述べたXPS法を用いることもできる。上述のようにXPSは、TOF-SIMS法に較べて、感度は劣るものの、異なる情報が得られ、また、二次元イメージングも可能なので、プローブ分析手段とし

て用いることができる。

#### 【0080】

他のプローブ分析手段としては、MALDI法をあげることができる。MALDI法では、前述のように調べたい物質の親イオンを検出できるので、チップのスポット部分のプローブを分析できるのできわめて都合がよい。ただし、プローブが共有結合によって基板に固定されている場合には、レーザー照射のみでは、被検物質が脱着イオン化しない場合があり、そのような場合には、本発明では、該レーザー照射によって切断され得る構造でプローブを基板に固定し、測定のためのレーザー照射によって、該構造が切断され、プローブが脱着イオン化する手段を講じる。

#### 【0081】

本発明では、これらのプローブ分析手段によって、プローブの定性、定量的分析、もしくは、プローブスポットの二次元イメージングをおこない、予め定められた基準に従って「良否」判定をおこなって出荷するなどの品質保証を行う。

#### 【0082】

他に、主として（場合によっては部分的な）二次元イメージングを行う手段として、本発明では、必要に応じてAFM法をはじめとするSPM法、または、SECM法、ESEM法等の手段を用いてチップの検査、品質保証を行う。ESEM法は低真空、かつ、その真空度での飽和水蒸気圧で測定ができるので、分析後のチップを利用できるという利点がある。

#### 【0083】

以上、本発明のプローブチップの製造方法、製造装置（群）、プローブチップ、プローブチップの品質保証方法について説明してきたが、プローブチップの品質保証方法に関しては、必要度の応じて、そのレベルは様々なケースが考えられ、例えば、これまで説明してきた、製造方法、製造装置（群）を用いて、スポットティング前のプローブ溶液中のプローブ、表面処理基板、スポットティング後のスポット、及び、スポットティング後に基板に固定化されたプローブの、全ての項目を分析検査する場合もあり、もしくは、その一部の項目を必要に応じて選択して分析検査することもあり得る。また、チップ全数を上記項目の全て、または、一

部について分析検査する場合もあり、チップの一部に関して分析検査することもある。また、それらのチップに関して、全てのプローブスポットに関して分析検査する場合もあり、一部のプローブスポットに関して分析検査する場合もあり得る。本発明では、これらの分析を状況に応じて、また、必要に応じておこない、プローブチップの品質保証を行う。

#### 【 0 0 8 4 】

##### 【発明の効果】

本発明の方法により、品質が十分に保証されたプローブチップの製造が可能となった。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

DNAプローブのガラス基板への結合方法の一例を示す図である。

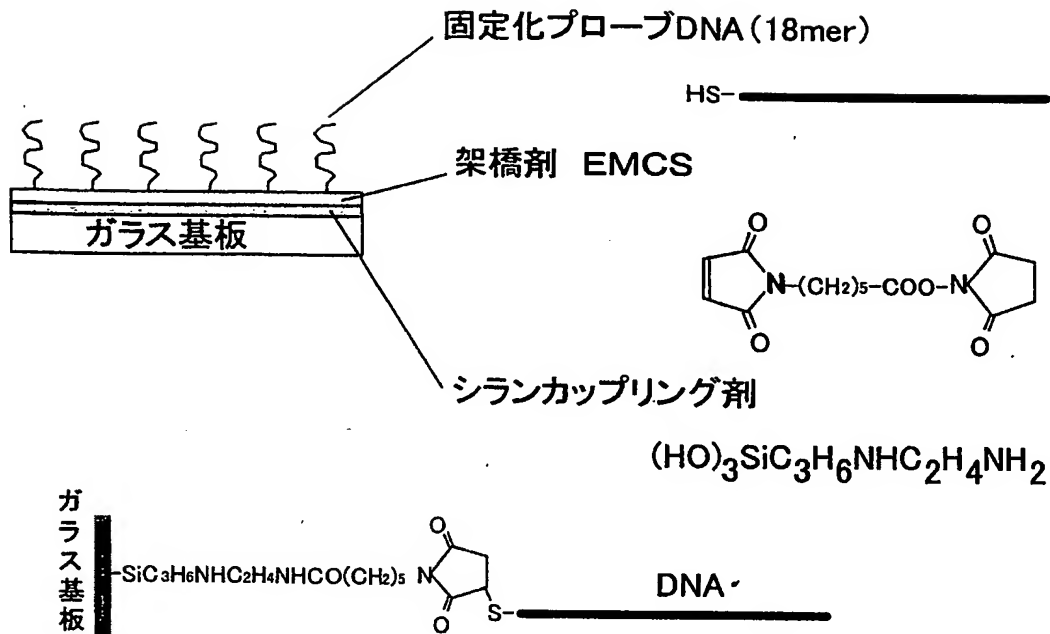


【書類名】

図面

【図 1】

# DNA結合反応



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 効果的な検査プログラム及び製造工程により品質保証されたプローブ担体を適用するための技術を提供すること。

【解決手段】 プローブの合成、精製から担体への固定までの各プロセスにおける検査項目を充実させることで、製造されるプローブ担体の品質を保証する。

【選択図】 なし

特願 2002-191421

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001007]

1. 変更年月日

1990年 8月30日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名

キャノン株式会社